

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 547.92.057

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ (22S,23S)- И (22R,23R)-3β-ГИДРОКСИ-22,23-ОКСИДО-5α-ЭРГОСТ-8(14)-ЕН-15-ОНОВ НА БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ И МЕТАБОЛИЗМ ЭКЗОГЕННОГО ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ НЕР G2

*А.Р. Мехтиев, Г.Е. Морозевич, В.С. Иванов, А.Ю. Мишарин**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
РАМН, 119992, Москва, Погодинская ул., 10;
эл. почта: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

Новые синтетические оксистерины (22S,23S)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (I) и (22R,23R)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (II) эффективно ингибировали биосинтез холестерина в клетках гепатомы человека линии Нер G2 при краткосрочной инкубации в безсывороточной среде ($IC_{50} = 1,9 \pm 0,2$ мкМ и $0,6 \pm 0,2$ мкМ соответственно). При культивировании клеток Нер G2 в присутствии 5 мкМ соединений (I) и (II) существенно подавлялся биосинтез холестерина (52% и 57% от контроля), наблюдались изменения в биосинтезе жирных кислот, триглицеридов и холестерилэфиров. Соединения (I) и (II) стимулировали превращение экзогенного холестерина в полярные продукты, секретируемые в культуральную среду (156% и 175% относительно контроля), что было показано в экспериментах с клетками Нер G2, предварительно меченными [3H]холестерином.

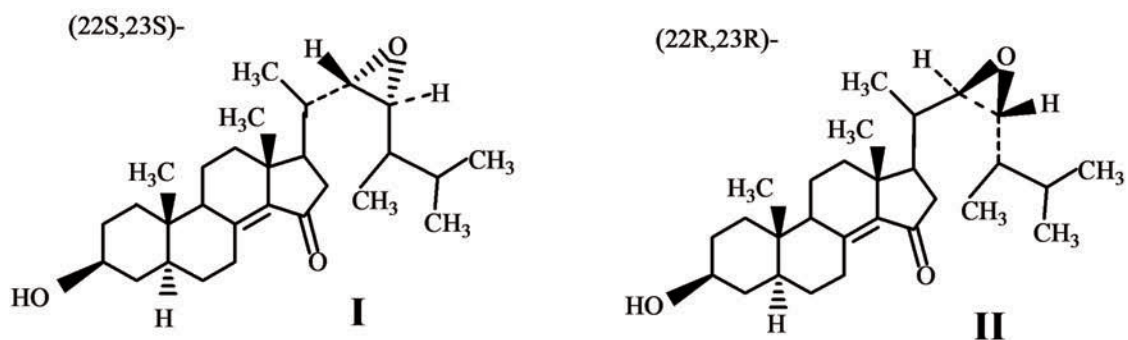
Ключевые слова : оксистерины, холестерин, липиды, метаболизм, клетки Нер G2.

ВВЕДЕНИЕ. Синтетические 15-оксигенированные стеринны эффективно подавляют биосинтез и регулируют метаболизм холестерина в культуре клеток млекопитающих и *in vivo* [1]. Однако использование 15-оксигенированных производных холестана (в частности 3β-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-она [1-3]) в качестве гипохолестеринемических лекарственных препаратов ограничено в связи с быстрой метаболической деградацией боковой цепи стерина в клетках печени, приводящей к потере биологической активности [4-8]. Поэтому получение новых 15-оксигенированных стериннов с модифицированной боковой цепью, устойчивой к метаболическим превращениям, и изучение биологической активности этих соединений в клетках печени является важной задачей.

Недавно нами был осуществлён синтез серии новых Δ8(14)-15-кетопроизводных ряда эргостана [9-12]. Два соединения из этой серии: (22S,23S)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (I) и (22R,23R)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (II) в предварительных экспериментах эффективно ингибировали биосинтез холестерина в клетках гепатомы человека линии Нер G2 [12].

Сокращения: HMG-CoA – гидроксиметилглутарил-кофермент А; АСАТ – ацил-кофермент А : холестерин-ацилтрансфераза; PBS – фосфат-содержащий физиологический раствор; FCS – эмбриональная сыворотка теленка; ХЭ – холестерилэфир, ПП – полярные продукты.

*Адресат для переписки



МЕТОДИКА. Химические реактивы и растворители получены от фирм “Aldrich” и “Sigma” (США); [^{14}C]ацетат Na, и [^3H]холестерин от “Amersham” (Англия); культуральный пластик от “Greiner” (США), “Costar” (США) и “Corning” (США), среды и эмбриональная сыворотка теленка от “Gibco BRL” (США) и “Hy Clone” (США); (22S,23S)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (**I**) и (22R,23R)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (**II**) синтезированы по методу [12].

Концентрацию белка определяли реакцией с бицинхониновой кислотой [13], ТСХ липидных экстрактов проводили на пластинках Kieselgel UV₂₅₄ фирмы “Merck” (Германия) в системе гексан-диэтиловый эфир- CH_3COOH (70:29:1) в присутствии внутренних стандартов (холестерина, холестерилолеата, триолеина, олеиновой кислоты); после проявления фракций в парах йода, зоны соскабливали и проводили измерение радиоактивности в толуольном сцинтилляторе на счётчике фирмы “LKB” (Швеция).

Клетки гепатомы человека линии Нер G2, полученные из Европейской коллекции клеточных культур (ЕАСС, Солсбери, Англия), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 в среде RPMI 1640 с 10% FCS. Клетки выращивали в 24- или 6- луночных планшетах. Соединения (**I**) и (**II**) добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0,4%.

*Влияние соединений (**I**) и (**II**) на уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 в безсывороточной среде.* К клеткам, предынкубированным 24 ч в безсывороточной среде, добавляли соединения (**I**) и (**II**) в различных концентрациях и инкубировали 3 ч, затем среду заменяли на свежую, содержащую [^{14}C] CH_3COONa (1 мкКи на 1 мл среды) и исследуемые соединения, и продолжали инкубацию 3 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3:2) [14] и разделяли ТСХ; клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Уровень биосинтеза холестерина рассчитывали по включению радиоактивной метки в холестерин, нормируя на содержание клеточного белка. Каждое определение проводили в трех повторах в трёх независимых экспериментах.

*Влияние соединений (**I**) и (**II**) на уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестероловых эфиров в клетках Нер G2 в 10% FCS.* Клетки инкубировали 24 ч с соединениями (**I**) и (**II**) в концентрации 5 мкМ в среде, содержащей 10% FCS, затем среду заменяли на свежую, содержащую [^{14}C] CH_3COONa (5 мкКи на 1 мл среды) и исследуемые соединения, и продолжали инкубацию 6 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3:2) и разделяли ТСХ, клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестероловых эфиров рассчитывали по включению радиоактивной метки в соответствующие фракции, нормируя на содержание клеточного белка. Каждое определение проводили в трех повторах в трёх независимых экспериментах.

Включение [^3H]холестерина в клетки Нер G2. Клетки инкубировали 24 ч в среде, содержащей соединения (I) и (II) в концентрации 5 мкМ и 10% FCS, затем среду заменяли на свежую, содержащую [^3H]холестерин (1 мКи /1 мл), исследуемые соединения и 10% FCS, и продолжали инкубацию 24 ч. Клетки трижды промывали PBS, охлажденным до 4°C. Для определения содержания радиоактивных продуктов в клетках, в каждую лунку вносили 300 мкл 0,05 М трис HCl буфера (pH 7,5), содержащего 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, 0,5% дезоксихолат Na и 0,1% додецилсульфат Na. Через 5 мин отбирали аликвоту для определения клеточного белка, остаток экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1 по объему), хлороформный экстракт упаривали в токе азота и остаток разделяли ТСХ, после чего определяли содержание радиоактивности во фракциях холестерина и холестериловых эфиров; водную фазу использовали для определения содержания радиоактивных полярных продуктов. Полученные значения нормировали на содержание клеточного белка.

Влияние соединений (I) и (II) на метаболизм [^3H]холестерина в клетках Нер G2. Клетки Нер G2, содержащие [^3H]холестерин, инкубировали 24 ч в среде, содержащей соединения (I) и (II) в концентрации 5 мкМ и 10% FCS, затем отделяли культуральную среду и проводили анализ радиоактивных продуктов в клетках и в культуральной среде отдельно, как указано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Культивирование клеток в отсутствии холестерина вызывает повышение активности HMG-CoA редуктазы и значительно стимулирует биосинтез холестерина *de novo* [15]. Первичное тестирование соединений (I) и (II) в качестве потенциальных ингибиторов биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 мы проводили в безсывороточной среде. На рисунке 1 представлен уровень биосинтеза холестерина из [^{14}C]ацетата при 3 ч инкубации с соединениями (I) и (II). В этих условиях кетостерины (I) и (II) эффективно подавляли биосинтез холестерина пропорционально их концентрации в среде, не влияя на уровень биосинтеза жирных кислот и триглицеридов. Рассчитанные значения IC_{50} для соединений (I) и (II) составляли $1,9 \pm 0,2$ мкМ и $0,6 \pm 0,2$ мкМ соответственно. Следует отметить, что в тех же условиях значение IC_{50} для известного ингибитора биосинтеза холестерина 3 β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она [2, 3] составляло $4,0 \pm 0,4$ мкМ.

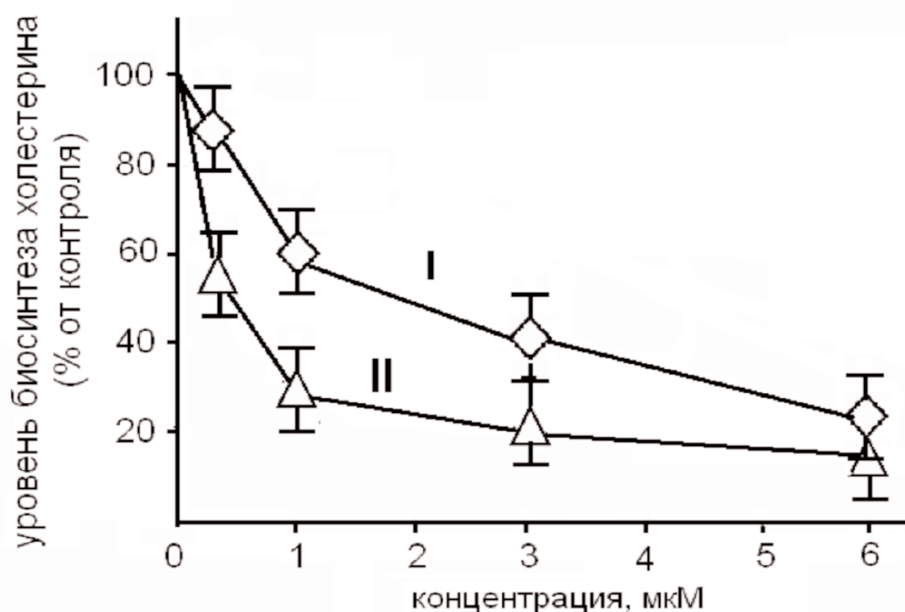


Рисунок 1.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 при 3 ч инкубации в безсывороточной среде (см. Методика). Контрольное значение (100%) составляло 21000 (имп./мин на 1 мг клеточного белка за 3 ч).

ВЛИЯНИЕ ОКСИСТЕРИНОВ НА ОБМЕН ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ

Следующей задачей была оценка уровня биосинтеза липидов (холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестерилвых эфиров) из [^{14}C]ацетата в клетках Нер G2 в обычных условиях культивирования клеток в присутствии соединений (I) и (II). Клетки Нер G2 преинкубировали в среде, содержащей кетостерины (I) и (II) в концентрации 5 мкМ и 10% FCS в течение 24 ч, после чего к клеткам добавляли [^{14}C]ацетат и продолжали инкубацию в той же среде еще 6 ч. Сравнительное содержание радиоактивных липидов, образовавшихся в клетках, представлено на рисунке 2.

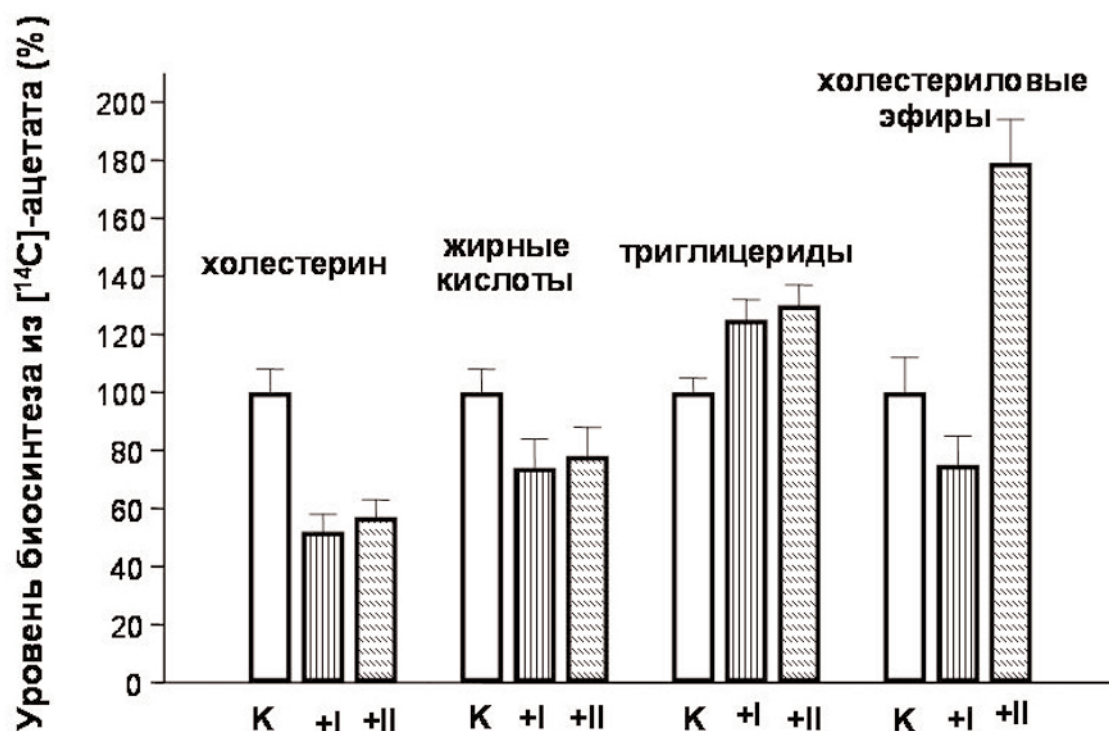


Рисунок 2.

Влияние соединений (I) и (II) в концентрации 5 мкМ на уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестерилвых эфиров в клетках Нер G2 при 24 ч инкубации в среде с 10% FCS. Контрольные значения, принятые за 100% составляли: для холестерина – 40100; для жирных кислот: 49900; для триглицеридов – 106000; для холестерилвых эфиров – 5600 (имп./мин на 1 мг клеточного белка за 6 ч).

Кетостерины (I) и (II) значительно подавляли уровень биосинтеза холестерина ($52 \pm 6\%$ и $57 \pm 6\%$ от контроля соответственно); содержание радиоактивных свободных жирных кислот в присутствии соединений (I) и (II) было достоверно снижено, а триглицеридов повышено. По-видимому, присутствие соединений (I) и (II) не оказывало существенного влияния на биосинтез жирных кислот, но стимулировало их включение в триглицериды. Соединения (I) и (II) оказывали различное влияние на включение радиоактивности в холестерилвые эфиры. Поскольку включение радиоактивности во фракцию холестерилвых эфиров зависит от скоростей биосинтеза холестерина, жирной кислоты и АСАТ-зависимого ацилирования холестерина, можно предполагать, что кетостерин (II) оказывал стимулирующее влияние на активность АСАТ.

Для оценки влияния кетостеринов **(I)** и **(II)** на метаболизм экзогенного холестерина клетки Нер G2, преинкубированные 24 ч в среде, содержащей кетостерины **(I)** и **(II)** в концентрации 5 мкМ и 10% FCS, инкубировали в той же среде в присутствии [^3H]холестерина в течение 24 ч, затем клетки, меченные [^3H]холестерином инкубировали 24 ч в среде без радиоактивности и анализировали радиоактивные продукты в клетках и в культуральной среде. Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице.

Присутствие соединений **(I)** и **(II)** не оказывало влияния на включение [^3H]холестерина в клетки (рис 3 А). Содержание радиоактивных метаболитов в клетке, образовавшихся в процессе инкубации в сумме составляло не более 17% (таблица). Последующее культивирование клеток, меченных [^3H]холестерином приводило к увеличению концентрации радиоактивных метаболитов и частичному выходу радиоактивных продуктов в среду. Присутствие кетостеринов **(I)** и **(II)** значительно увеличивало содержание радиоактивных полярных продуктов (рис. 3 Б) и не влияло на содержание радиоактивных холестериловых эфиров (рис. 3 В).

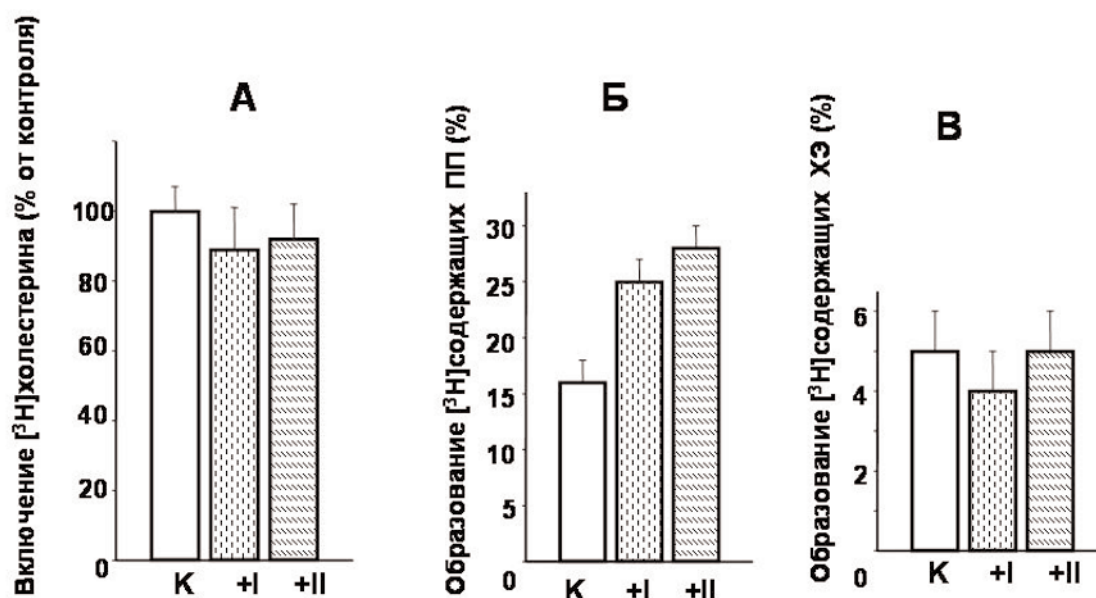


Рисунок 3.

А – Содержание радиоактивности в клетках Нер G2 после 24 ч инкубации в среде, содержащей [^3H]холестерин в отсутствии (К) и в присутствии соединений **(I)** и **(II)**. Контрольное значение (100%) составляло 611300 (имп./мин на 1 мг клеточного белка).

Б - Содержание радиоактивных полярных продуктов после 24 ч инкубации меченых клеток в отсутствии (К) и в присутствии соединений **(I)** и **(II)** (см. Методика); значение для контрольной инкубации составляло 101700 (имп./мин на 1 мг клеточного белка) - (16%).

В - Содержание радиоактивных холестериловых эфиров после 24 ч инкубации меченых клеток в отсутствии (К) и в присутствии соединений **(I)** и **(II)** (см. Методика); значение для контрольной инкубации составляло 29000 (имп./мин на 1 мг клеточного белка) - (5%).

ВЛИЯНИЕ ОКСИСТЕРИНОВ НА ОБМЕН ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ

Таблица. Влияние кетостеринов (I) и (II) на содержание радиоактивных продуктов в клетках НЕР G2 и в инкубационной среде (в % от общего содержания радиоактивности в образце).

В клетках после преинкубации с [³ H]холестерином			
содержание	контроль	+(I)	+(II)
холестерин	86	83	86
ХЭ	7	7	7
ПП	7	10	7
В клетках после 24 ч инкубации			
содержание	контроль	+(I)	+(II)
холестерин	88	90	84
ХЭ	10	6	12
ПП	2	4	4
В среде после 24 ч инкубации			
содержание	контроль	+(I)	+(II)
холестерин	76	66	61
ХЭ	4	3	5
ПП	20	32	35

В таблице приведено относительное содержание [³H]холестерина и его метаболитов в клетке и культуральной среде. Из рисунка 3 и таблицы следует, что культивирование клеток Нер G2 в присутствии соединений (I) и (II) ускоряет превращение экзогенного холестерина в полярные продукты (156% и 175% относительно контроля, соответственно) и стимулирует выведение полярных метаболитов из клетки в культуральную среду. Дальнейшие исследования полярных продуктов необходимы для ответа на вопрос о влиянии соединений (I) и (II) на активность стерин-метаболизирующих ферментов (в первую очередь, митохондриальной стерин-27-гидроксилазы CYP27A1), а также на активность неспецифических оксидаз CYP1A1, CYP1A2 и CYP3A4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные в работе результаты свидетельствуют, что Δ8(14)-15-кетопроизводные ряда эргостана (I) и (II) эффективно регулируют метаболизм липидов в клетках Нер G2, причем регуляторная активность зависит от стереохимической конфигурации атомов С-22 и С-23. В отличие от родственных 15-кетостеринов ряда холестана, соединения (I) и (II) проявляют регуляторные свойства в условиях продолжительной инкубации в среде, содержащей липиды и липопротеины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ 06-04-48803).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schroepfer G.J.* (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 361-554.
2. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Chen H.W., Kandutsch A.A.* (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8975-8980.
3. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Kandutsch A.A.* (1980) US Patent 4.202.891
4. *Schroepfer G.J., Chu A.J., Needleman D.H., Izumi A., Nguen P.T., Wang K.-S., Little J.M., Sherrill B.C., Kisic A.* (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4110-4123.
5. *Schroepfer G.J., Pajewsky T.N., Hylarides M., Kisic A.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 1027-1032.
6. *St. Pyrek J., Vermilion J.L., Stephens T.W., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 4536-4543.
7. *Monger D.J., Schroepfer G.J.* (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **47**, 21-46.
8. *Пуйр Е.А., Игнатов Д.В., Медведева Н.В., Мишарин А.Ю.* (2003) *Биоорганическая химия*, **29**, 648-654
9. *Мишарин А.Ю., Тимофеев В.П.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30**, 84-88.
10. *Пуйр Е.А., Медведева Н.В., Каширина Н.М., Шевелев А.Я., Мишарин А.Ю.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30**, 547-551.
11. *Флегентов Г.Ю., Пуйр Е.А., Медведева Н.В., Ткачев Я.В., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю.* (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 312-319.
12. *Misharin A.Yu., Ivanov V.S., Mehtiev A.R., Morozevich G.E., Tkachev Ya.V., Timofeev V.P.* (2007). *Steroids* (2006), doi: 10.1016/j.steroids.2006.12.002 (available online ahead the print).
13. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* (1985) *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
14. *Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S.* (1979) *Methods Enzymol.*, **98**, 241-261.
15. *Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.* (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 1125-1131.

Поступила: 21. 12. 2006.

EFFECTS OF (22S,23S)-3 β -HYDROXY-22,23-OXIDO-5 α -ERGOST-8(14)-EN-15-ONE AND (22R,23R)-3 β -HYDROXY-22,23-OXIDO-5 α -ERGOST-8(14)-EN-15-ONE ON LIPID BIOSYNTHESIS AND EXOGENEOUS CHOLESTEROL METABOLISM IN HEP G2 CELLS

A.R. Mehtiev, G.E. Morozevich, V.S. Ivavov, A.Yu. Misharin

Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119992,
e-mail : alexander.misharin@ibmc.msk.ru

Novel synthetic oxysterols (22S,23S)-3 β -hydroxy-22,23-oxido-5 α -ergost-8(14)-en-15-one (**I**) and (22R,23R)-3 β -hydroxy-22,23-oxido-5 α -ergost-8(14)-en-15-one (**II**) efficiently inhibited cholesterol biosynthesis in human hepatoma Hep G2 cell line at a short time incubation in a serum free medium (IC_{50} = 1.9 \pm 0.2 and 0.6 \pm 0.2 μ M, respectively). Cultivation of Hep G2 cells in the presence of compound 5 μ M concentration of both (**I**) and (**II**), led to significant depression of cholesterol biosynthesis (52% and 57% from control), and remarkable changes in fatty acids, triglycerides, and cholesteryl esters biosynthesis. Compounds (**I**) and (**II**) stimulated transformation of exogenous cholesterol to polar products secreted into the culture medium (156% and 175% from control), that was shown in experiments in Hep G2 cells prelabeled with [3 H]cholesterol.

Key words: oxysterols, cholesterol, lipid metabolism, Hep G2 cells.